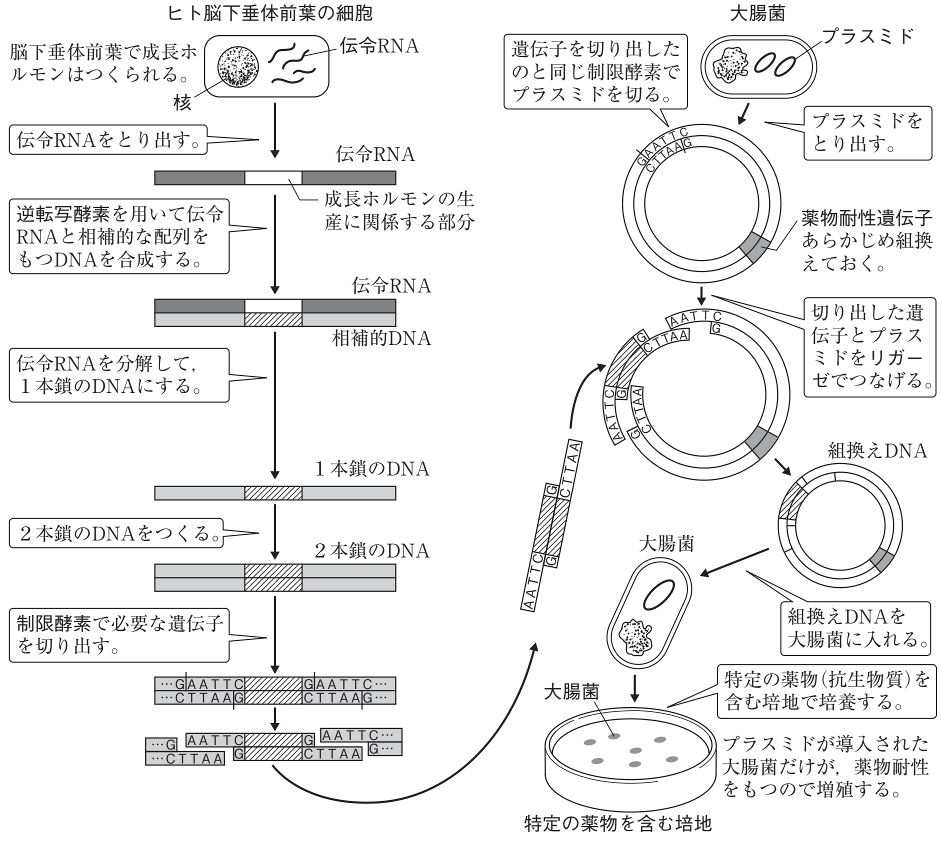
第24講　バイオテクノロジー①

■遺伝子組換え

…制限酵素とリガーゼを用いて，特定の遺伝子をプラスミドに組み込み，大腸菌に導入する。外来の有用遺伝子を組み込むことで，さまざまな物質を合成させることが出来る。

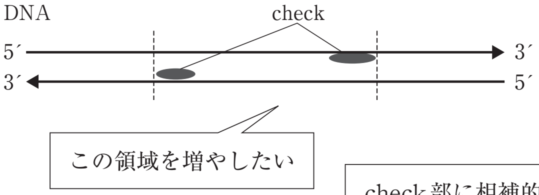
ex　ヒトの成長ホルモンの合成



ⒸRECRUIT HOLDINGS
本サービスに関する知的財産権その他一切の権利は著作権者に帰属します。
また本サービスに掲載の全部または一部につき無断複製・転載を禁止します。

■PCR法

…DNA増幅法



反応溶液に，目的の領域を含むDNA断片，大量のヌクレオチド，DNAポリメラーゼ，大量のプライマーを入れる

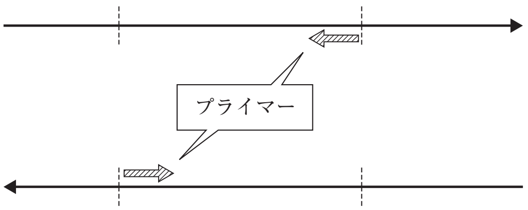
check部に相補的に結合する短いDNA断片（RNA断片の場合もあり）ポリメラーゼによるDNA合成の起点となる。方向性に注意が必要。

温泉に生息する好熱性細菌より抽出，最適温度は72℃，90℃以上の条件でも熱変性しない。

Step1　95℃にて

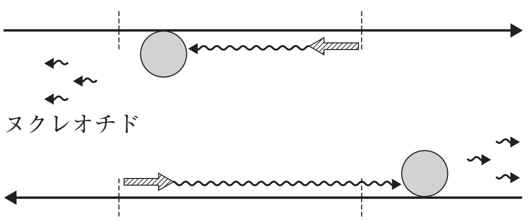
・水素結合がほどけて，２本鎖DNAから１本鎖DNAへ

Step2　55℃にて



・多量に存在するプライマーがcheck部に結合

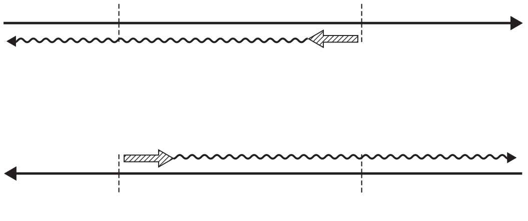
Step3　72℃にて



・最適温度にてDNAポリメラーゼがDNA合成開始

：DNAポリメラーゼ

：新生されたヌクレオチド鎖



Step1からStep3を繰り返すことで，DNAは２倍に増幅される。１サイクル10分程度で終了する。
一晩PCR装置を動かしておくだけで，１分子のDNAから十分な量のDNA断片を得ることが出来る。

©RECRUIT HOLDINGS

本サービスに関する知的財産権その他一切の権利は著作権者に帰属します。
また本サービスに掲載の全部または一部につき無断複製・転載を禁止します。

第24講　演習問題

遺伝子組換えに関する次の文章を読み，問１～6に答えよ。

ヒトの遺伝子Ｘが組込まれたプラスミド（組換えプラスミド）を得るために，次の〔実験〕を行なった。この実験では，制限酵素として，Ａ，Ｂ，Ｃの３種類の酵素を使用した。これらの制限酵素は，図１に示すようにそれぞれ特定の６塩基対の塩基配列を認識し，矢印が示す線のようにDNAを切断する。一方，ヒトの遺伝子Ｘの近くには，図２のように３種類の制限酵素の切断部位が存在している。実験に使用したプラスミドは，図３に示すように抗生物質アンピシリンを無毒化する*amp*^{R}遺伝子および抗生物質カナマイシンを無毒化する*kan*^{R}遺伝子をもっており，*kan*^{R}遺伝子の中央には，制限酵素Ａの切断部位が存在する。

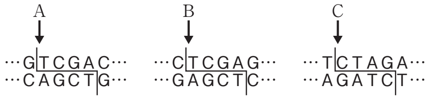


図１

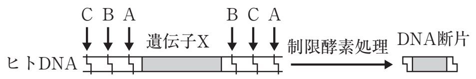


図２

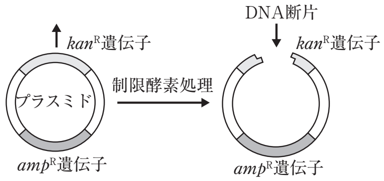


図３

〔実験〕

操作１：ヒトの遺伝子Ｘを含む２本鎖DNAを，制限酵素Ａ，Ｂ，Ｃのうちの１種類，あるいは２種類を含む液で処理し，遺伝子Ｘを含むDNA断片を切り出した。

操作２：プラスミドを制限酵素Ａで切断した。

操作３：操作１の遺伝子Ｘを含むDNA断片と操作２で切断したプラスミドを混合し，DNAリガーゼを作用させて切断部位をつなぎ合わせ，組換えプラスミドを得た。

操作４：操作３で得られた組換えプラスミドを大腸菌に取り込ませた。

操作５：操作４で得られた大腸菌を寒天平板培地上で培養し，コロニーの形成を調べた。

問１　操作１～操作３において，次の(イ)～(ホ)の酵素液を用いて切断した遺伝子Ｘを含むDNA断片を，制限酵素Ａで切断したプラスミドにつなぎ合わせる実験を行なった。このときに，遺伝子Ｘの組換えプラスミドが得られる酵素液はどれか。正しいものをすべて選び，記号で答えよ。

(イ)　制限酵素Ａのみを含む液　　(ロ)　制限酵素Ｂのみを含む液

(ハ)　制限酵素Ｃのみを含む液　　(ニ)　制限酵素ＡとＢを含む液

(ホ)　制限酵素ＡとＣを含む液

©RECRUIT HOLDINGS

本サービスに関する知的財産権その他一切の権利は著作権者に帰属します。
また本サービスに掲載の全部または一部につき無断複製・転載を禁止します。

問2　問1でDNA断片がプラスミドに組込まれるとき，その接合部(1本鎖になった4塩基部分)は特定の塩基どうしで結合する。この性質を何と呼ぶか。

問3　操作5において，大腸菌を次の(イ)〜(ニ)の寒天平板培地上で培養した。組換えプラスミドを取り込んだ大腸菌がコロニーを形成できる寒天平板培地をすべて選び，記号で答えよ。

(イ)　アンピシリンのみを含む寒天培地
(ロ)　カナマイシンのみを含む寒天培地
(ハ)　アンピシリンとカナマイシンのどちらも含む寒天培地
(ニ)　アンピシリンとカナマイシンのどちらも含まない寒天培地

問4　操作5において，組換えプラスミドを取り込んだ大腸菌のコロニーを特定する場合，そのコロニーを選ぶ方法として正しいものを，次の(イ)〜(ハ)の中から選び，記号で答えよ。

(イ)　アンピシリンを含む寒天培地で生育するコロニーを，カナマイシンを含む寒天培地に植え付けると，コロニーが形成されないもの
(ロ)　カナマイシンを含む寒天培地で生育するコロニーを，アンピシリンを含む寒天培地に植え付けると，コロニーが形成されないもの
(ハ)　アンピシリンとカナマイシンの両方を含む寒天培地でコロニーが形成されるもの

問5　この実験で得られた組換えプラスミドを取り込んだ大腸菌は，1時間に1回分裂する。この大腸菌1個を寒天培地に植え付け，5時間培養すると，そのコロニーに含まれる大腸菌全体の組換えプラスミドの数はいくつか。ただし，大腸菌は同時に分裂し，大腸菌1個には組換えプラスミドが常に10個含まれているものとする。

問6　問1で得られるすべての組換えプラスミドを大腸菌から精製し，制限酵素Aで切断を試みた場合，どのような結果が予測されるか。次の(イ)〜(ハ)の中から正しいものを選び，記号で答えよ。

(イ)　すべての組換えプラスミドから，遺伝子Xを含むDNA断片を切り出すことができる。
(ロ)　すべての組換えプラスミドから，遺伝子Xを含むDNA断片を切り出すことができない。
(ハ)　遺伝子Xを含むDNA断片を切り出せる組換えプラスミドと切り出せない組換えプラスミドの両者がある。

©RECRUIT HOLDINGS

本サービスに関する知的財産権その他一切の権利は著作権者に帰属します。
また本サービスに掲載の全部または一部につき無断複製・転載を禁止します。

第24講　確認テスト

核酸とPCR法に関する以下の設問に答えよ。

核酸はDNAとRNAの２種類に分けられ，どちらも構成単位であるヌクレオチドが多数結合したポリヌクレオチドである。ヌクレオチドには塩基が含まれており，DNAとRNAに含まれる塩基を比較すると，[1]はRNAのみに含まれる。また，２本鎖DNAにはAと[2]が同数含まれている。

バイオテクノロジーの発展に伴い，試験管内の反応により，わずかなDNAを増幅することで均一で多量のDNAを得る方法が開発された。この方法はPCR法（ポリメラーゼ連鎖反応法）と呼ばれ，現在では，遺伝子診断や犯罪捜査などにも活用されている。

PCR法では，増幅する2本鎖DNAの両端の複製を開始させる部分それぞれに相補的な塩基配列を持つ短い１本鎖DNAを2種類人工的に作製する。この短い１本鎖DNAはプライマーと呼ばれている。実際の反応では，増幅させる2本鎖DNA，２種類のプライマー，DNAポリメラーゼと４種類のヌクレオチドなどを加えた反応液を，まず，(1)95℃に加熱する。この加熱により増幅するDNAを１本鎖に分離する。次に，(2)反応液の温度を素早く60℃まで冷やす。この操作により２本のプライマーが1本鎖状態のDNAのそれぞれの複製を開始する部分に結合する。さらに，(3)反応液の温度を72℃に加熱する。この操作によりDNAポリメラーゼがはたらき，プライマーに続く相補的なDNA鎖が合成される。(1)→(2)→(3)の操作を何度も繰り返すことで目的のDNAを多量に増幅する。仮に，増幅させたい2本鎖DNAが1個含まれている反応液を準備して，この操作を繰り返した場合，3回繰り返した後の反応液中にはDNAは[3]個含まれる。10回繰り返した後の反応液中にはDNAは[4]個含まれ，反応開始前に含まれていたDNA鎖を含むDNAは[5]個存在する。

ヒトのあるタンパク質を大腸菌で生産させるプラスミドを作製するために，あるタンパク質のmRNAを酵素を用いた逆転写反応によって，mRNAと相補的な配列をもつ２本鎖DNAを合成した。その後，ア<u>この2本鎖DNAにおいてタンパク質の開始コドンにあたる領域と終止コドンにあたる領域にそれぞれ相補的な2種類のプライマーを人工的に作製して，PCR法によりこのDNAを増幅した</u>。イ<u>増幅したDNAをプラスミドに組み込むことにより，タンパク質生産用のプラスミドを完成させた</u>。

問１　文章中の[1]，[2]に入るもっとも適切なものを次の①～⑤の中からそれぞれ１つずつ選べ。ただし，同じものを２回選んでもよい。

①　A　　②　C　　③　G　　④　T
⑤　U

©RECRUIT HOLDINGS
本サービスに関する知的財産権その他一切の権利は著作権者に帰属します。
また本サービスに掲載の全部または一部につき無断複製・転載を禁止します。

問２　K，N，O，P，Sの元素の中で核酸には**含まれないもの**の組み合わせを次の①～⑩の中から１つ選べ。

①　K，N　　②　K，O　　③　K，P　　④　K，S
⑤　N，O　　⑥　N，P　　⑦　N，S　　⑧　O，P
⑨　O，S　　⑩　P，S

問３　文章中の［３］～［５］に入るもっとも適切なものを次の①～⑩の中からそれぞれ１つずつ選べ。ただし，同じものを２回以上選んでもよい。

①　1　　②　2　　③　4　　④　7
⑤　8　　⑥　16　　⑦　20　　⑧　256
⑨　1024　　⑩　2048

問４　PCR法によるDNA増幅と細胞分裂時のDNA複製を比較した説明文A～Eのうち正しいものの組み合わせとしてもっとも適切なものを次の①～⑩の中から１つ選べ。

A．DNAの二重らせんがほどかれて１本鎖となる原理は両者共に同じである。
B．DNAの二重らせんがほどかれて１本鎖となる原理は両者の間で異なり，一方は酵素を必要とする。
C．PCR法によるDNA増幅のみ保存的複製の原理でDNAが合成される。
D．両者共に半保存的複製の原理でDNAが合成される。
E．PCR法によるDNA増幅のみ半保存的複製の原理でDNAが合成される。

①　A，B　　②　A，C　　③　A，D　　④　A，E
⑤　B，C　　⑥　B，D　　⑦　B，E　　⑧　C，D
⑨　C，E　　⑩　D，E

問５　PCR法によるDNA増幅に用いられるDNAポリメラーゼの性質に関する説明文A～Eのうち正しいものの組み合わせとしてもっとも適切なものを次の①～⑩の中から１つ選べ。

A．酵素の最適温度は60℃から95℃である。
B．酵素の最適温度は60℃から72℃である。
C．酵素の最適温度は72℃以上である。
D．95℃の高熱下でも安定である。
E．95℃の高熱下では変性し，失活する。

①　A，B　　②　A，C　　③　A，D　　④　A，E
⑤　B，C　　⑥　B，D　　⑦　B，E　　⑧　C，D
⑨　C，E　　⑩　D，E

©RECRUIT HOLDINGS

本サービスに関する知的財産権その他一切の権利は著作権者に帰属します。
また本サービスに掲載の全部または一部につき無断複製・転載を禁止します。

第24講　演習問題

問１　(イ)，(ロ)，(ニ)

問２　相補性

問３　(イ)，(ニ)

問４　(イ)

問５　320個

問６　(ハ)

ⒸRECRUIT HOLDINGS
本サービスに関する知的財産権その他一切の権利は著作権者に帰属します。
また本サービスに掲載の全部または一部につき無断複製・転載を禁止します。

第24講　確認テスト

問１　[1]　⑤　[2]　④　　問２　④
問３　[3]　⑤　[4]　⑨　[5]　②
問４　⑥　　問５　⑥

【解説】

問１　RNAとDNAはともに核酸であり，その構成単位はヌクレオチドである。両者のヌクレオチドの組成は異なり，RNAは五炭糖としてリボース，塩基としてAUGCが，DNAでは五炭糖としてデオキシリボース，塩基としてATGCが用いられる。またRNAのヌクレオチド鎖は一本鎖であるのに対して，DNAは二本鎖であり，二重らせん構造をとっている。DNAの二本鎖は相補的であり，AとT，GとCの量はそれぞれ等しい。ゆえに，[1]は⑤，[2]は④が正解となる。

問２　核酸を構成するヌクレオチドはリン酸と五炭糖，塩基からなり，それぞれを構成する元素はリン酸（P，H，O），五炭糖（C，H，O），塩基（C，H，O，N）である。ゆえに，④のK，Sは核酸に含まれない。

問３　PCR法は一連の操作を一巡することでDNA分子の数が２倍になる。ゆえに，３回操作を繰り返した後の反応溶液中には$2^3=8$個のDNA分子が含まれ，10回操作を繰り返した後の反応溶液中には$2^{10}=1024$個のDNA分子が含まれることになる。また，反応開始前に含まれていた二本鎖DNAは開裂してそれぞれが鋳型鎖として利用され，その後も反応溶液中に残り続けることになる。そのため，何回操作を繰り返しても元々のDNA鎖を含むDNAが２個存在し続ける。ゆえに，[3]は⑤，[4]は⑨，[5]は②が正解となる。

問４　PCR法によるDNA増幅では，二重らせんがほどかれる場合，熱によって塩基間の水素結合が切断されているのに対して，細胞分裂に先立つDNA複製では酵素によって二重らせんがほどかれる。ゆえに，Bが正しい。またPCR法によるDNA増幅でも細胞分裂に先立つDNA複製でも，開裂したDNA１本鎖のそれぞれを鋳型として相補的なヌクレオチド鎖が合成され，半保存的にDNA２本鎖が複製される。ゆえに，Dが正しい。以上より，⑥B，Dが正解となる。

問５　PCR法では，温泉に生息する好熱性細菌由来の耐熱性のDNAポリメラーゼが用いられる。このDNAポリメラーゼは二本鎖の開裂がおきる95℃の高温条件下でも変性せず，最適温度は60℃から72℃である。ゆえに，⑥B，Dが正解となる。

ⒸRECRUIT HOLDINGS
本サービスに関する知的財産権その他一切の権利は著作権者に帰属します。
また本サービスに掲載の全部または一部につき無断複製・転載を禁止します。